

JP11137254/PN

L3 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX (C) 2002 THOMSON DERWENT  
ACCESSION NUMBER: 1999-374375 [32] WPINDEX  
DOC. NO. CPI: C1999-110781  
TITLE: Preparation of trans-glutaminase - derived from Bacillus  
genus microbe.  
DERWENT CLASS: B04 D16  
PATENT ASSIGNEE(S): (AJIN) AJINOMOTO KK  
COUNTRY COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

| PATENT NO   | KIND | DATE     | WEEK      | LA | PG | MAIN       | IPC |
|-------------|------|----------|-----------|----|----|------------|-----|
| JP 11137254 | A    | 19990525 | (199932)* |    | 11 | C12N015-09 | <-- |

APPLICATION DETAILS:

| PATENT NO   | KIND | APPLICATION    | DATE     |
|-------------|------|----------------|----------|
| JP 11137254 | A    | JP 1997-306155 | 19971107 |

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1997-306155 19971107  
INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: C12N015-09  
SECONDARY: C12N009-10  
INDEX: C12N015-09, C12R001:125; C12N009-10, C12R001:19

BASIC ABSTRACT:

JP 11137254 A UPAB: 19990813

NOVELTY - The preparation of transglutaminase (TG) comprises culturing an Escherichia genus microbe carrying a DNA fragment containing TG gene derived from a Bacillus genus microbe and expressing the gene in which the expression of said TG gene is induced during the period between the time when the logarithmic growth of said Escherichia genus microbe is slowed down and the time when the growth of said microbe reaches stationary state.

USE - For preparation of transglutaminase.,

Dwg.0/4

FILE SEGMENT: CPI  
FIELD AVAILABILITY: AB  
MANUAL CODES: CPI: B04-F10A3; B04-F10A3E; B04-F10B1; B04-L04;  
B04-L0400E; D05-C03D; D05-H12A; D05-H14A1; D05-H17A3

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-137254

(43)公開日 平成11年(1999)5月25日

|                          |       |               |
|--------------------------|-------|---------------|
| (51)Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | F I           |
| C 1 2 N 15/09            | Z N A | C 1 2 N 15/00 |
| 9/10                     |       | 9/10          |
| // (C 1 2 N 15/09        | Z N A |               |
| C 1 2 R 1:125)           |       |               |
| (C 1 2 N 9/10            |       |               |

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-306155

(22)出願日 平成9年(1997)11月7日

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 橋口 賢一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素  
株式会社中央研究所内

(72)発明者 横関 健三

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素  
株式会社中央研究所内

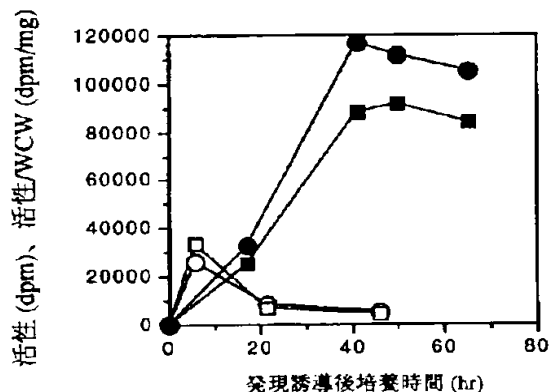
(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54)【発明の名称】 パチルス属細菌由来のトランスグルタミナーゼの製造法

(57)【要約】

【課題】 エシェリヒア属細菌を用いて、枯草菌由来のトランスグルタミナーゼを活性を有する形態で製造する方法を提供する。

【解決手段】 パチルス属細菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を含むDNA断片を保持するエシェリヒア属細菌を培養し、該細菌の対数増殖が鈍化した時期から該細菌の生育が定常期に達する時期の間に前記トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現を誘導する。



—○— : mid log phaseで誘導、活性  
 —●— : 生育鈍化後誘導、活性  
 —□— : mid log phaseで誘導、Wet cell weight当り活性  
 —■— : 生育鈍化後誘導、Wet cell weight当り活性

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス属細菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を含むDNA断片を保持するエシェリヒア属細菌を培養し、該遺伝子を発現させることによりトランスグルタミナーゼを製造する方法において、前記エシェリヒア属細菌の対数増殖が鈍化した時期から該細菌の生育が定常期に達する時期の間に前記トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現を誘導することを特徴とする方法。

【請求項2】 エシェリヒア属細菌細胞中にトランスグルタミナーゼが蓄積されることを特徴とする請求項1記載の方法

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トランスグルタミナーゼの製造法に関し、詳しくは、遺伝子組換え技術を利用してバチルス属細菌由来のトランスグルタミナーゼをエシェリヒア属細菌を用いて製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トランスグルタミナーゼ（以下、「TG」という）は、ヘパチド鎖内にあるグルタミン残基の $\alpha$ -カルボキサミド基を基質とし、アシル転移反応を触媒する酵素である。該反応において、ヘパチド鎖内のリジン残基の $\epsilon$ -アミ基がアシル受容体となるときは、ヘパチド分子内あるいは分子間に $\epsilon$ -( $\alpha$ -Glu)-Lys架橋結合（以下、「G1結合」と略する）が形成する。水がアシル受容体となるときは、グルタミン残基に脱アミド反応が生じ、グルタミン残基がグルタミン酸残基になる。

【0003】TGを利用することにより、種々の架橋高分子化合物を製造することができ、そのようにして製造された架橋高分子化合物は、豆腐、プリン、ヨーグルト、チーズ、揚げ身、練製品、ソーセージ等の畜肉製品等の食品、化粧料等として用いられる。

【0004】従来、TGは多くの動物組織に存在することが知られていた。例えば、モルモットの肝臓（Connellan et al., Journal of Biological Chemistry 246巻1098-1098頁(1971)）に存在し、研究されている。また、微生物のTGについては、放線菌、枯草菌（M.V. Ramaniam et al., FASEB J. 4巻A2521）、粘菌（J.D. Klein et al., J. Bacteriol. 174巻2599-2605頁）で報告されている。産業的には放線菌の生産するTGが実用化されている（特公平6-65280号公報、特開平1-27471号公報）が、放線菌は一般の細菌に比べて生育速度が遅いため、培養時間が長くなり、それゆえ生産コストの増大を招く。

【0005】一方、枯草菌由来のTGを産業に応用する場合、従来知られている枯草菌由来のTGが5 mMの $\text{Ca}^{2+}$ によって阻害されるので実際の食品系では使用できないという問題があったが、5 mMの $\text{Ca}^{2+}$ 存在下で活性を示すTGを産生する枯草菌が見出され、枯草菌由

来のTGの産業上での応用が可能となっている（特開平9-131180号）。また、この枯草菌由来のTG遺伝子を用い、遺伝子組換え技術を利用してTGを製造する技術も開発されている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、エシェリヒア属細菌等に枯草菌由来のTG遺伝子を導入し、該遺伝子を発現させてTGを生産させようとする場合、TGタンパク質が会合し、封入体（inclusion body）を形成する場合が多い。この封入体から活性を有するTGを得るためには、封入体の可溶化、TGタンパク質の巻き戻しという操作が必要となるが、枯草菌由来のTGタンパク質の封入体から活性を有するTGタンパク質を得ることは困難である。また、枯草菌由来のTGを活性を有する形態で十分な量生産させることは、成功するには至っていない。

【0007】本発明は、上記観点からなされたものであり、エシェリヒア属細菌を用いて、枯草菌由来のTGを活性を有する形態で製造する方法を提供することを課題とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、バチルス属細菌由来のTG遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を培養してTGを生産させる際に、TG遺伝子の発現を特定の培養時に誘導することによって、TGを活性を有する形態で効率よく生産させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、バチルス属細菌由来のTG遺伝子を含むDNA断片を保持するエシェリヒア属細菌を培養し、該遺伝子を発現させることによりTGを製造する方法において、前記エシェリヒア属細菌の対数増殖が鈍化した時期から該細菌の生育が定常期に達する時期の間に前記TG遺伝子の発現を誘導することを特徴とする方法である。

【0010】本発明は、好ましい態様として、上記方法において、エシェリヒア属細菌細胞中にTGが蓄積されることを特徴とする方法を提供する。

## 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0012】TG1 本発明に用いるTG遺伝子

本発明に用いるバチルス属細菌由来のTG遺伝子は、バチルス属細菌由来のTGをコードするDNAを含み、かつエシェリヒア属細菌細胞内で所望の培養時にTGの発現を誘導することが可能な遺伝子である。このようなTG遺伝子は、エシェリヒア属細菌細胞内で発現誘導が可能なプロモーターに、バチルス属細菌由来のTGをコードするDNAを連結することにより得られる。

【0013】TGをコードするDNAが由来するバチルス属細菌としては、TGを産生するバチルス属細菌であ

れば特に制限されないが、具体的にはハチルス・スプチリス、(*Bacillus subtilis*)、ハチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、ハチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、ハチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、ハチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、ハチルス・スフェアリクス (*Bacillus sphaericus*)、ハチルス・ポリミキサ (*Bacillus polymyxa*)、ハチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alcalophilus*) 等が挙げられる。

【0014】これらの中では、ハチルス・スプチリスが好ましく、特にハチルス・スプチリス AJ1286 及び AJ1307 が好ましい。ハチルス・スプチリス AJ1286 は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (以下、「生命研」と略する) に、1995 年 2 月 2 日付けて寄託されており、その寄託番号は FERM P-14750 である。また、ハチルス・スプチリス AJ1286 は、1995 年 1 月 4 日付けてワタハスト条約に基づく国際寄託に移管されており、その国際寄託番号は FERM BP-5325 である。ハチルス・スプチリス AJ1307 は生命研に、1995 年 8 月 2 日付けて寄託されており、その寄託番号は FERM P-15123 である。また、ハチルス・スプチリス AJ1307 は、1996 年 1 月 18 日付けてワタハスト条約に基づく国際寄託に移管されており、その国際寄託番号は FERM BP-5367 である。

【0015】上記のようなハチルス属細菌から、TG をコードする DNA を取得する方法について説明する (特開平9-131180号参照)。はじめに、精製された TG のアミノ酸配列を決定する。エドマン法 (Edman, P., *Acta Chem. Scand.* 4, 227 (1950)) を用いてアミノ酸配列を決定することができる。また Applied Biosystems 社製のシーケンサーを用いてアミノ酸配列を決定することができる。

【0016】明らかとなったアミノ酸配列に基づいて、これをコードする DNA の塩基配列を演繹できる。DNA の塩基配列を演繹するには、ユニバーサルコドンあるいはハチルス属細菌の遺伝子中でもっとも頻繁に用いられるコドンを採用する。

【0017】演繹された塩基配列に基づいて、30〜50 の塩基対程度の DNA 分子を合成する。該 DNA 分子を合成する方法は Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981) に開示されている。また、Applied Biosystems 社製のシンセサイザーを用いて該 DNA 分子を合成できる。該 DNA 分子は、ハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA 全長を、ハチルス属細菌染色体遺伝子ライブラリーから単離する際に、プローブとして利用できる。あるいは、ハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA を PCR 法で増幅する際に、プライマーとして利用できる。ただし、PCR 法を用いて増幅される DNA はハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA 全長を含んでいないことがあるので、PCR 法を用いて増幅される DNA

をプローブとして用いて、ハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA 全長をハチルス属細菌染色体遺伝子ライブラリーから単離することが好ましい。

【0018】PCR 法の操作については、White, T. J. et al., *Trends Genet.* 5, 185 (1989) 等に記載されている。ハチルス属細菌の染色体 DNA を調製する方法については、*Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons Ltd (1990) 等に記載されている。ハチルス属などの細菌染色体遺伝子ライブラリーを作成する方法については、*Molecular Biological Methods for Bacillus*, John Wiley & Sons Ltd (1990) 等に記載されている。DNA 分子をプローブとして用いて、遺伝子ライブラリーから目的とする DNA 分子を単離する方法については、*Molecular Cloning*, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) 等に記載されている。

【0019】単離された TG をコードする DNA の塩基配列を決定する方法は、*A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, Inc. (1985) に記載されている。また、Applied Biosystems 社製の DNA シーケンサーを用いて、塩基配列を決定することができる。

【0020】ハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA の一つを配列表配列番号 1 に示す。該 DNA はハチルス・スプチリス AJ1307 株の染色体 DNA から単離されたものである。ハチルス属細菌由来の TG をコードする DNA は、配列表配列番号 1 に示される DNA だけではない。すなわち、ハチルス属に属する細菌の種及び株ごとに、塩基配列の違いが観察されるはずだからである。

【0021】また、ハチルス属細菌の染色体 DNA から単離された TG をコードする DNA に人工的に変異 (例えばコードされる TG が 1 若しくは 2 以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は付加を含み、かつ TG 活性が維持されるような変異) を加えて、塩基配列を変更することができる。人工的に変異を加える方法として頻繁に用いられるものとして、*Method. in Enzymol.* 151 (1987) に記載されている部位特異的変異導入法がある。

【0022】ハチルス・スプチリス AJ1307 由来の TG をコードする DNA とバクテリオファージ DNA とが接続されて得られる組み換え DNA (pBST675-11) を細胞内に有する *Escherichia coli* AJ13172 は生命研に、1995 年 1 月 20 日付けて、ワタハスト条約に基づいて国際寄託されており、その国際寄託番号は FERM BP-5346 である。pBST675-11 は、pUC18 にハチルス・スプチリス AJ1307 由来の TG をコードする配列を含む約 2 kb の DNA 断片が挿入されたプラスミドであり、TG をコードする DNA が *lacZ'* ( $\beta$ -ガラクトシターゼの N 末端側の一部分をコードする配列) の下流に接続されており、*lac* プロモーター制御下で TG の N 末端側に 11 アミノ酸残基からなるペプチドが付加された融合タンパクを発現す

るようにデザインされている(特開平9-131180号参照)。pBS1G75-11をHindIII及びBamHIで消化すると、TGをコードするDNA配列が得られる。

【0023】TGをコードするDNAを発現させるプロモーターとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモーターであって、任意の培養期に発現誘導可能なプロモーターであれば使用することができ、例えば、trcプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、PLプロモーター、lacプロモーター等の強力なプロモーターが挙げられる。

【0024】TG遺伝子を大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、Col E1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミド、あるいはその誘導体が挙げられる。また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモーターを持つ発現ベクターが市販されている(pTrec9A(ファルマシア製)、pUC系(宝酒造(株)製)、pPDK系(クロンテック製)、pKK233-2(クロンテック製)ほか)。

【0025】TG遺伝子の下流には、転写終結配列であるターミネーターを連結してもよい。ターミネーターとしては、T7ターミネーター、tdファージターミネーター、T4ターミネーター、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネーター、大腸菌trpA遺伝子のターミネーター等が挙げられる。

【0026】上記ベクターに、プロモーター、バチルス属細菌由来のTGをコードするDNA、必要に応じてターミネーターの順に連結したDNA断片が挿入されたプラスミドで大腸菌を形質転換することにより、バチルス属細菌由来のTG遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌が得られる。尚、上記のベクターには、TGをコードするDNAを発現させるのに好適なプロモーターを含んでいるものがあり、そのようなベクターを用い、ベクターに含まれるプロモーターに下流にバチルス属細菌由来のTGをコードするDNAを連結する場合には、別産プロモーターをベクターに挿入する必要はない。

【0027】TG遺伝子を含むベクターをエシェリヒア属細菌に導入するには、D.M. Morrisonの方法(Methods in Enzymology 68, 326 (1979))あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970))等、通常のエシェリヒア属細菌の形質転換に用いられる方法により行うことができる。

【0028】本発明に用いるエシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ等、エシェリヒア属に属する微生物であれば特に制限されないが、具体的にはナイトハルトらの著書(Neidhardt, F.C. et al., Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, American Society for

Microbiology, Washington D.C., 1988, table 1)に挙げられるものが利用できる。たとえば、エシェリヒアコリ JM109 株や, MC1061 株などがあげられる。

【0029】上記のようにして得られるTG遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を培養するのに用いる培地としては、実施例で述べる2×YT培地(Biotrypton 1.6%, Yest extract 1.0%, NaCl 0.5%)の他、M9+カナミノ酸培地、LB培地などの通常大腸菌を培養するのに用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

【0030】本発明においては、バチルス属細菌由来のTG遺伝子を含むDNA断片を保持するエシェリヒア属細菌を培養する際に、該エシェリヒア属細菌の対数増殖が鈍化した時期から該細菌の生育が定常期に達する時期の間にTG遺伝子の発現を誘導する。対数増殖が鈍化する時期よりも前にTG遺伝子の発現を誘導すると、TGの生産量が低い。あるいは生産量が高くても大半のTGが封入体を形成し、活性を有するTGはわずかに生産されないか、対数増殖が鈍化した時期から定常期に達する時期の間にTG遺伝子の発現を誘導すると、TGの一部は封入体を形成したとしても、活性を有するTGが細胞内に蓄積する。

【0031】対数増殖が鈍化する時期あるいは定常期に達する時期は、使用するエシェリヒア属細菌、ベクター、プロモーター及び培地の種類、並びに培養条件等によって異なるが、設定した条件で予備的に培養を行い、経時的に生菌数又は吸光度を測定し、グラフにプロットして生育曲線を作成することによって、容易に調べることができる。また、特に好ましい誘導時期は、経時的に菌体抽出液のTG活性を測定することにより知ることができる。さらに、誘導をかけた後の培養時間も、同様にして適宜設定すればよい。

【0032】生産されたバチルス属細菌由来のTGは、エシェリヒア属細菌の菌体を溶解又は破碎し、菌液又は破碎液から不溶性画分を除去すれば、粗酵素液として得ることができる。さらに、必要に応じて、通常の沈殿、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりTGを精製して用いることも可能である。この場合、TGに対する抗体を利用した精製法も利用できる。

【0033】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。尚、本発明は実施例の記載に限定されない。

【0034】1. 枯草菌由来TGのエシェリヒア・コリでの直接発現系の構築

(1) 染色体DNAライブラリーの作製

バチルス・ズブチリス AJ1307株の染色体DNA 1  $\mu$ g をHindIIIで完全に消化した。エクソール沈殿によってDNAを回収した後、10  $\mu$  lの10、1 TEに溶解した。このうち5  $\mu$  lと、HindIIIで消化されてさらにB

APによる脱リン酸化処理を受けたpUC118(宝酒造製)1ngとを混合し、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造製)を用いて連結反応を行った。エシェリヒア・コリJM109株のコソピテン・セル(宝酒造製)100 $\mu$ lとライゲーション反応液3 $\mu$ lとを混合して、エシェリヒア・コリJM109株を形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

#### 【0035】(2)プローブの作製

プローブには、TIG遺伝子を含む枯草菌染色体DNAのHindIII断片をpUC118にクローニングしたプラスミド(pBSTG75-11)(特開平9-131180号公報[実施例10参照])に含まれているTIG遺伝子の全長を用いた。pBSTG75-11に含まれているTIGをコードする配列は、配列表配列番号1において塩基番号118〜1042に相当する。尚、pBSTG75-11によって形質転換されたエシェリヒア・コリJM109株(AJ13172)は生命研に、1995年12月20日付けで、FERM BP-5546の寄託番号で、ブタハスト条約に基づいて国際寄託されている。

【0036】pBSTG75-11を鋳型にして、Primer S2(配列番号2)及びPrimer S3(配列番号3)を用いてPCR反応を行った。PCR反応は、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2に従って行った。

【0037】鋳型であるpBSTG75-11を10ng、Primer S2及びPrimer S3を各20 $\mu$ mol含む100 $\mu$ lの反応液を調製して反応を行った。なお、Primer S2はTIG遺伝子の配列番号1の塩基配列118番目から152番目の35塩基に相補するプライマー、Primer S3はTIG遺伝子の配列番号1の塩基配列818番目から852番目の35塩基に相補するプライマーである。PCRの反応は以下の条件で30サイクル行った。

#### 【0038】

94℃ 30秒

55℃ 30秒

72℃ 1分

【0039】上記の反応で増幅されたDNA断片を1%アガロースゲル(Seaplaque GTG、FMC社製)電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、EasyPrep System(ファルマシア社製)とPCR Products Prep Kit(ファルマシア社製)を用いてDNAを精製した。最終的に4ng/ $\mu$ lのDNA溶液200 $\mu$ lを得た。

【0040】このDNA断片を32Pで標識し、プローブとした。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 3000Ci/mmol(アマシヤム社製)とRandom Primer DNA Labeling Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いて説明書通りにプローブの標識を行った。

【0041】(3)コロニーハイブリダイゼーション  
コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)に記載されている方法に準拠して行った。

【0042】染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロシメンブレンフィルター(Hybond-N、アマシヤム社

製)にうつし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはRapid-hyb buffer(アマシヤム社製)を用いて行った。フィルターを該バッファー中に浸し、65℃で4時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上記で作製した標識プローブを添加し、65℃で2時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1%SSSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1%SSSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。その結果、プローブとハイブリダイスするコロニーを5株確認できた。

【0043】(4)TIG遺伝子のDNAシーケンス  
選択した形質転換体が保有するプラスミドのうち(pBSTG3-1と命名した)をMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)に記載される方法に従って調製し、pUC118に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。シーケンス反応は、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(ABI社製)を用いて説明書に従って行った。また、電気泳動は、DNA Sequencer 373(ABI社製)を用いて行った。その結果、配列表配列番号1に示した塩基配列を有することを確認した。

【0044】(5)TIG直接発現プラスミドの構築  
上記のようにして得られたプラスミドpBSTG3-1から、枯草菌由来TIG遺伝子を含むHindIII-BamHI断片をpHSG99にサブクローニングし、pHSG9TGを作製した(図1)。pHSG99は、lacプロモーターの制御下で発現するlacZ'を有しており、その直下にHindIII部位及びBamHI部位が存在する。

【0045】枯草菌由来TIG遺伝子中、N末端<チオニンのコドン直前の塩基配列を、配列番号4に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチド[NdeI]を用いて、部位特異的変異導入法により2塩基置換し、N末端<チオニンのコドンの部分にNdeI部位を導入した(141、pHSG9TG(Nde))。これにより、得られたプラスミドを制限酵素NdeIで消化することによって、N末端<チオニンのコドンの直前のT(チミン)の上流に、任意の塩基配列を接続することを可能にした。

【0046】次いで、配列番号5及び6に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチド[SD1F及びSD1R]をアニールして得られるDNA断片を、HindIII及びNdeIで消化したpHSG9TG(Nde)と連結し、pHSG9TG(Nde)のHindIII-NdeI断片を前記の合成DNA断片で置き換えることによって、lacプロモーター制御下で枯草菌由来TIGを直接発現出来る発現系を構築した(図2、pHSD1TG)。前記の合成DNA断片(以下、5'フランキンク領域、という)は、両端にHindIII切断配列及びNdeI切断配列を有し、内部にlacZ'の3'末端側の一部と、SD(Shine-Dalgarno)配列とを有している。pHSD1TGにおいて、合成DNA断片中のlacZ'の3'末端側の一部は、pHSG99由来のlacプロモーターに続くlacZ'の3'末端側に接続しており、lacプロモーターの制御下で、lacZ'及びTIG遺伝子

を発現させることかできる。尚、*lacZ*'のコート配列とTG遺伝子との間には、*lacZ*'と同一フレームの終止コドン、及びSD配列が存在し、TGは融合タンパク質としてではなく、単独で発現するように設計されている。

【0047】(2) 枯草菌由来TGのエシェリヒア・コリにて直接発現

上記で構築したpUSD1TGから、枯草菌由来TG遺伝子(5'フランキング領域を含む)を含むHindIII-BamHI断片を切り出し、これをHindIII及びBamHIで消化したpUC19に連結することによって、pUSD1TGを構築した(図2)

【0048】pUSD1TGでエシェリヒア・コリ JM109株を形質転換し、得られた形質転換株をアンピシリン100 $\mu$ g/mlを含む2 $\times$ YT培地(Biotrypton 1.6%, Yest extract 1.0%, NaCl 0.5%)にて37 $^{\circ}$ C、一夜培養した。この培養液1mlを、0.2%カザミノ酸とアンピシリン100 $\mu$ g/mlとを含む2 $\times$ YT培地100mlに接種して、37 $^{\circ}$ Cにて振盪培養した。培地の波長600nmの吸光度が0.4~0.5に達した時点(対数増殖期中期(midlog phase))で、1mM IPTG(イソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)を培地に添加して*lac*プロモーターの発現を誘導し、更に6時間、37 $^{\circ}$ Cにて振盪培養した。この段階で菌体を顕微鏡観察すると、菌体内に封入体が形成されていた。ヘクター(pUC19)のみを保持株では封入体の形成は観察されなかった。

【0049】集菌後、0.85% NaClにて菌体を洗浄し、S buffer (20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 50mM NaCl, pH 8)に懸濁し、更に0.2mg/ml リゾチームを加えて水上で1時間処理した後、超音波破碎した。破碎液を10,000 $\times$ gで10分遠心分離し、沈殿を0.5% Triton X-100を含むS bufferにて2回洗浄し、10mM EDTA (pH8) 溶液に懸濁して、封入体の画分とした。

【0050】得られた封入体をSDS-PAGEに供したところ、その分子量は、特開平9-131180号公報に開示されている枯草菌由来TGの分子量(約28,000~約30,000)と一致した。また、封入体を8M 尿素にて溶解後、尿素濃度が2.5Mになる様に希釈し、その遠心上清をPVDF膜にしみこませ、20%メタノールにて1時間洗浄後、Applied Biosystems社製プロテインシーケンサーにて、封入体を形成した蛋白質のN末端アミノ酸配列を決定した。その結果、封入体を形成した蛋白質のN末端アミノ酸10残基は、特開平9-131180号公報に開示されている枯草菌由来TGのN末端アミノ酸配列と一致した。以上のことから、pUSD1TGにて枯草菌由来TGが直接発現されていることが確認された。

【0051】(3) 発現誘導時期の変更によるTG活性体蓄積量の増大

pUSD1TG上の枯草菌由来TG遺伝子を、pTrec99A (Pharmacia Co. より購入) に載せ、枯草菌由来TGが*trc*プロモーター制御下で発現可能なプラスミドpTcSD1TGを

作製した(図3)。すなわち、pUSD1TGをNheIで消化した後、切断末端を平滑化し、さらにBamHIで消化して得られるTG遺伝子断片(5'フランキング領域を含む)を、BamHI及びSmaIで消化したpTrec99Aに連結した。pTrec99Aは、*trc*プロモーターを有しており、その直下にSmaI部位及びBamHI部位が存在する。

【0052】pTcSD1TGでエシェリヒア・コリ JM109株を形質転換し、得られた形質転換株をアンピシリン100 $\mu$ g/mlを含む2 $\times$ YT培地(Biotrypton 1.6%, Yest extract 1.0%, NaCl 0.5%)にて37 $^{\circ}$ C、一夜培養後、培養液1mlを0.2%カザミノ酸とアンピシリン100 $\mu$ g/mlとを含む2 $\times$ YT培地100mlに接種して37 $^{\circ}$ Cにて振盪培養した。培養液の波長600nmの吸光度が0.4~0.5に達した時点(対数増殖期中期)、または波長600nmの吸光度が3.2~4.0に達した時点(対数増殖が鈍化した時点)で、1mM IPTGを培地に添加して発現を誘導し、更に37 $^{\circ}$ Cにて振盪培養した。

【0053】集菌後、菌体を0.85% NaClにて洗浄し、K buffer (50mM TrisHCl, 10mM EDTA, 2mM DTT, pH7.5)に懸濁し、0.2mg/ml リゾチームと0.02mg/ml DNase Iを加えて37 $^{\circ}$ C、40分処理後、15mM MgSO<sub>4</sub>を加えて37 $^{\circ}$ Cで更に15分処理し、50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH10)を加え、1M NaOHにてpHを10.2に調整した後、37 $^{\circ}$ Cで更に30分処理した。この処理液を12,000 $\times$ gで30分遠心分離し、上清中の枯草菌由来TG活性を、特開平9-131180号公報に記載された方法に従って、<sup>14</sup>Cラベルされたフトレッシンのシメチルカゼインへの取込活性として測定した。菌体の湿重量(wet cell weight)当たりのTG活性及び培養液0.1ml当たりのTG活性を図4に示す。

【0054】図4に示されるように、対数増殖が鈍化してから誘導をかけた場合の方が、対数増殖期中期で誘導をかけた場合に比べて、培養液当たりで約4.5倍、湿重量当たりで約2.6倍高いTG活性が得られた。

【0055】

【発明の効果】本発明により、エシェリヒア属細菌を用いて、枯草菌由来のTGを活性を有する形態で製造することができ。

【0056】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1042

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: バチルス・サブティリス (Bacillus subtilis)

株名: A1-1307

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 118..855

特徴を決定した方法:

## 配列

|   |     |
|---|-----|
| CTGCTTAAAA AGTTTAAAA TAAAAATGG AAGAAGTTCT TTTGGCAGT CTTCTGTCTT  | 60  |
| TTTAGCTTTC ATTGCCAAG CTCTTGCAT ATCTTATATA AACAAAGGGG GCTAAAC    | 117 |
| ATG ATT ATT GTA TCA GGA CAA TTG CTC CGT CCC CAG GAT ATT GAA AAT | 165 |
| Met Ile Ile Val Ser Gly Gln Leu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Glu Asn |     |
| 1 5 10 15   |     |
| TGG CAG ATT GAT CAA AAT CTG AAT CCG CTG TTA AAA GAG ATG ATT GAG | 213 |
| Trp Gln Ile Asp Gln Asn Leu Asn Pro Leu Leu Lys Glu Met Ile Glu |     |
| 20 25 30  |     |
| ACG CCT GTT CAG TTT GAT TAT CAT TCA ATT GCT GAA CTG ATG TTT GAG | 261 |
| Thr Pro Val Gln Phe Asp Tyr His Ser Ile Ala Glu Leu Met Phe Glu |     |
| 35 40 45  |     |
| CTT AAA CTG CGG ATG AAT ATT GTA GCA GCG GCA AAG ACG CTG CAC AAA | 309 |
| Leu Lys Leu Arg Met Asn Ile Val Ala Ala Ala Lys Thr Leu His Lys |     |
| 50 55 60  |     |
| AGC GGG GCG AAG TTT GCC ACT TTT TTA AAA ACA TAC GGG AAT ACA ACG | 357 |
| Ser Gly Ala Lys Phe Ala Thr Phe Leu Lys Thr Tyr Gly Asn Thr Thr |     |
| 65 70 75 80   |     |
| TAT TGG AGG GTT TCA CCG GAG GGC GCC TTG GAG CTG AAA TAC AGA ATG | 405 |
| Tyr Trp Arg Val Ser Pro Glu Gly Ala Leu Glu Leu Lys Tyr Arg Met |     |
| 85 90 95  |     |
| CCG CCT TCA AAA GCG ATT CGG GAC ATT GCA GAG AAC GGC CCG TTT TAT | 453 |
| Pro Pro Ser Lys Ala Ile Arg Asp Ile Ala Glu Asn Gly Pro Phe Tyr |     |
| 100 105 110   |     |
| GCG TTT GAA TGC GCA ACC GCA ATC GTT ATC ATT TAT TAC TTG GCC TTA | 501 |
| Ala Phe Glu Cys Ala Thr Ala Ile Val Ile Ile Tyr Tyr Leu Ala Leu |     |
| 115 120 125   |     |
| ATC GAT ACA ATC GGT GAA GAT AAA TTC AAT GCC AGC TTT GAC AGA ATT | 549 |
| Ile Asp Thr Ile Gly Glu Asp Lys Phe Asn Ala Ser Phe Asp Arg Ile |     |
| 130 135 140   |     |
| ATT TTA TAT GAC TGG CAT TAT GAG AAA TTG CCG ATC TAT ACG GAA ACA | 597 |
| Ile Leu Tyr Asp Trp His Tyr Glu Lys Leu Pro Ile Tyr Thr Glu Thr |     |
| 145 150 155 160   |     |
| GGA CAC CAC TTT TTC CTT GGA GAT TGT TTG TAT TTT AAG AAT CCT GAA | 645 |
| Gly His His Phe Phe Leu Gly Asp Cys Leu Tyr Phe Lys Asn Pro Glu |     |
| 165 170 175   |     |
| TTT GAT CCG CAA AAG GCG CAA TGG AGA GGC GAA AAT GTG ATT TTA CTG | 693 |
| Phe Asp Pro Gln Lys Ala Gln Trp Arg Gly Glu Asn Val Ile Leu Leu |     |
| 180 185 190   |     |
| GGG GAA GAT AAA TAT TTT GCC CAT GGT CTT GGA ATC TTA AAC GGA AAG | 741 |
| Gly Glu Asp Lys Tyr Phe Ala His Gly Leu Gly Ile Leu Asn Gly Lys |     |
| 195 200 205   |     |
| CAA ATT ATA GAT AAG CTG AAT TCT TTT AGG AAA AAA GGA GCC TTA CAG | 789 |
| Gln Ile Ile Asp Lys Leu Asn Ser Phe Arg Lys Lys Gly Ala Leu Gln |     |
| 210 215 220   |     |
| TCA GCC TAC CTT CTG TCT CAG GCG ACC AGA CTG GAT GTT CCG TCT CTT | 837 |
| Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gln Ala Thr Arg Leu Asp Val Pro Ser Leu |     |
| 225 230 235 240   |     |
| TTC CGC ATC GTC CGC TAAAAAGCCC CATCGCCTAT TTTCGGGACG ATGGGGTTTC | 892 |

Phe Arg Ile Val Arg

245

AAATGCCTTT CGTTTTCGAT AGAAGGGGGC TGTGCCGAAA TATTGGTTTCG CAGCCCCTC 952  
 CATTTTTTCA AGGTCATTTC TTGTCACGAT TGGATCCTGG CTGCTCCATT TGATAAAGCG 1012  
 GACAAAATAG TAGCCTTTGA TAGGAACCAT 1042

【0057】配列番号：2

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル：No

配列

ATGATTATTG TATCAGGACA ATTGCTCGT CCCCA 35

【0058】配列番号：3

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル：No

配列

GGGACGATG CGGAAAAGAG ACGGAACATC CAGTC 35

【0059】配列番号：4

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル：No

配列

ATACAATAAT CATATGTAGC CCC 23

【0060】配列番号：5

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル：No

配列

AGCTTCGAAG CTAGCTAAAA CTCTAAGAAG GAGATATCA 39

【0061】配列番号：6

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル：No

配列

TAATGATATCT CCTTCTTAAA GTTTTAGCTA GCTTCGA 37

【図面の簡単な説明】

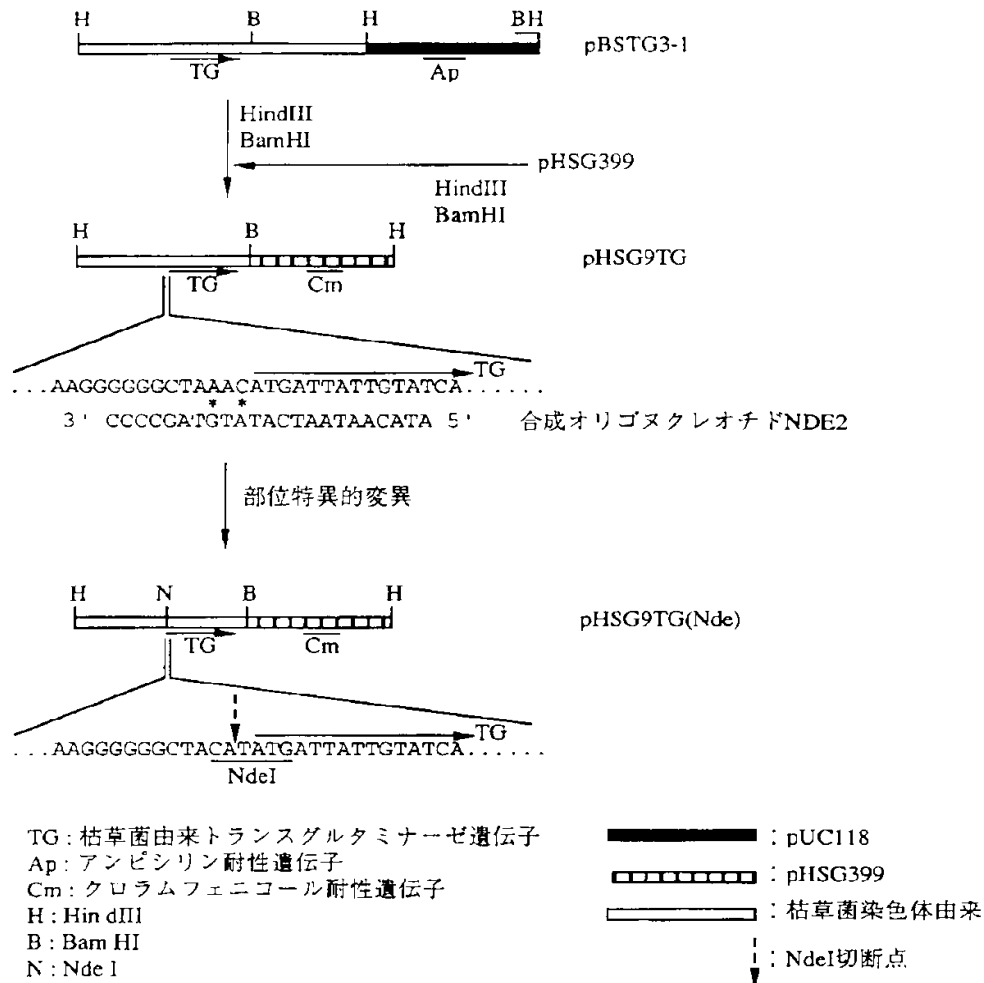
【図1】 NdeI部位を導入した枯草菌由来TG遺伝子を含むプラスミドpHSG9TG(Nde)の構築過程を示す図。

【図2】 枯草菌由来TG遺伝子を直接発現するプラスミドpHSD1TG及びpUSD1TGの構築過程を示す図。

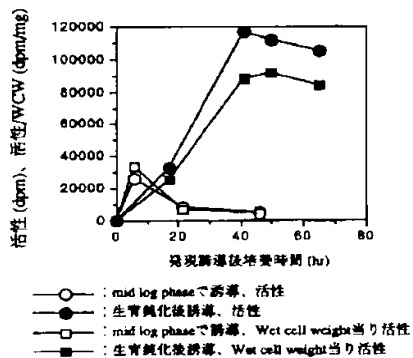
【図3】 trcプロモーターにより枯草菌由来TG遺伝子を直接発現するプラスミドpTcSD1TGの構築過程を示す図

【図4】 エシェリヒア・コリJM109(pTcSD1TG)の菌体中のTG活性を示す図。

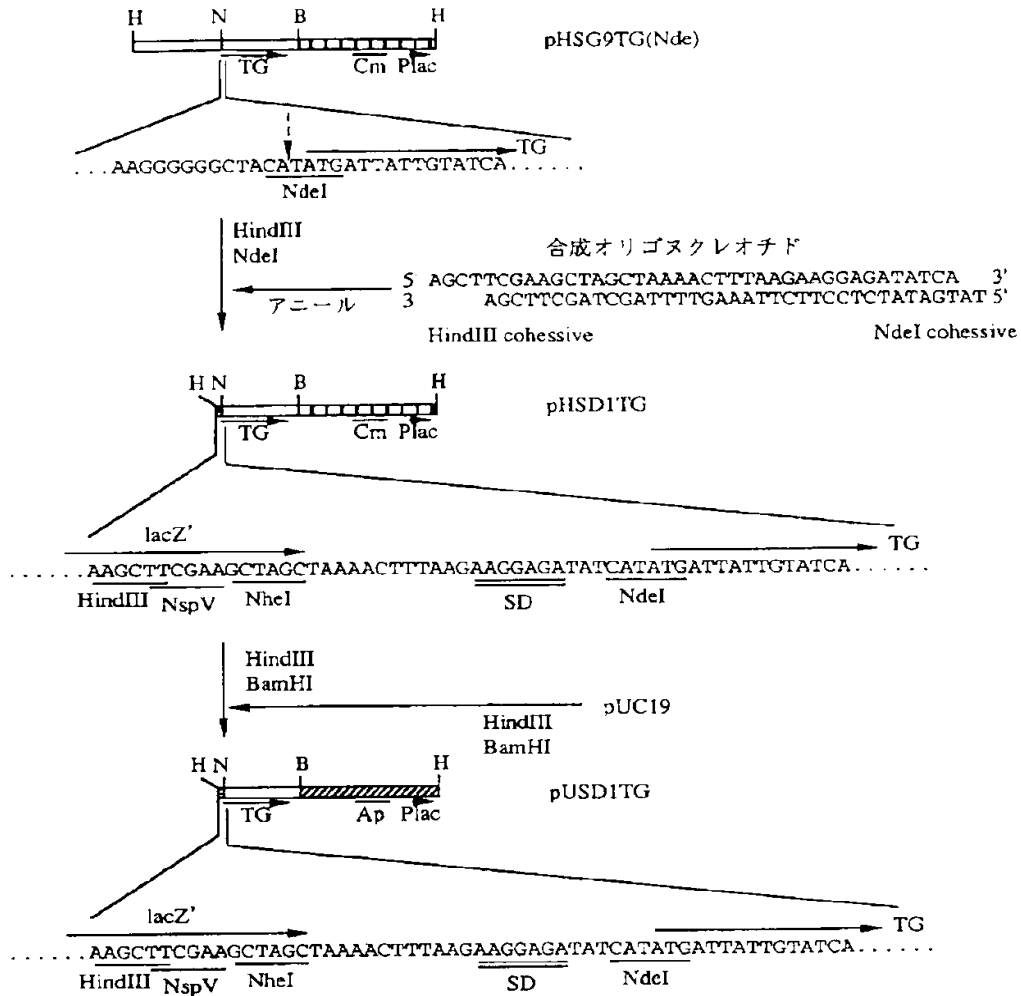
【図1】



【図4】



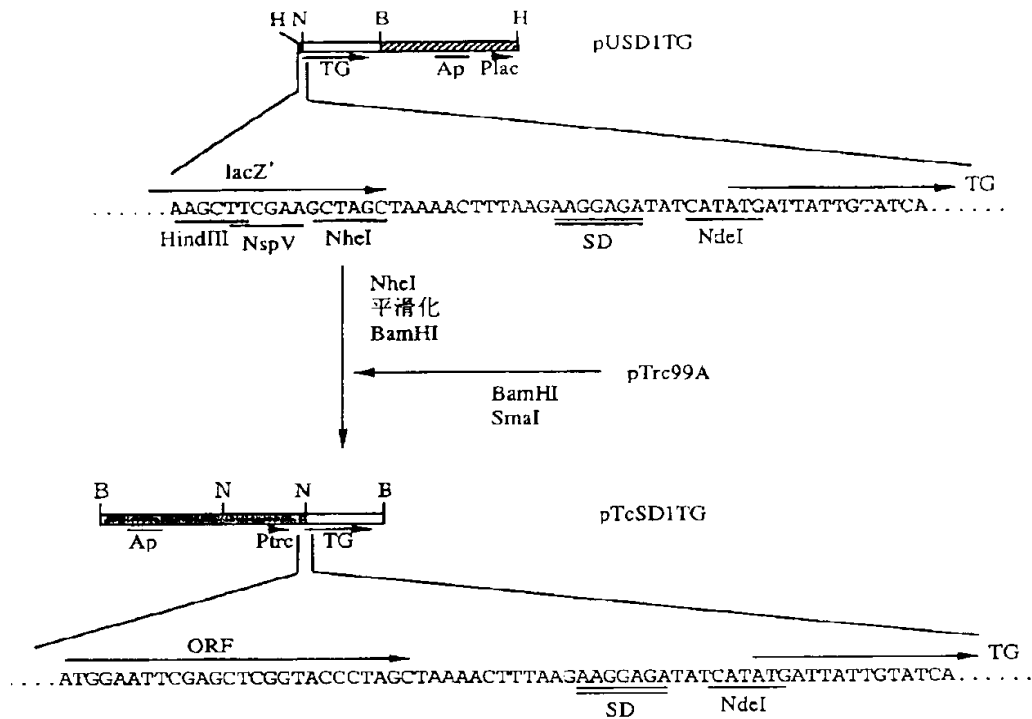
【図2】



TG: 枯草菌由来トランスグルタミナーゼ遺伝子  
 Ap: アンピシリン耐性遺伝子  
 Cm: クロラムフェニコール耐性遺伝子  
 Plac: lacプロモーター  
 lacZ': βガラクトシダーゼN末端側一部分  
 SD: リボゾーム結合部位  
 H: HindIII、B: BamHI、N: NdeI

▨: pUC19  
 ▤: pHSG399  
 ▬: 枯草菌染色体由来  
 ■: 合成DNA部分

【図3】



TG: 枯草菌由来トランスグルタミナーゼ遺伝子  
 Ap: アンピシリン耐性遺伝子  
 Ptrc: trcプロモーター  
 Plac: lacプロモーター  
 lacZ':  $\beta$ ガラクトシダーゼN末端側一部分  
 ORF: pTrc99A由来ペプチド  
 SD: リボソーム結合部位  
 H: HindIII、B: BamHI、N: NdeI

▨ : pUC19  
 ■ : pTrc99A  
 □ : 枯草菌染色体由来  
 ▮ : 合成DNA部分

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>  
 C12R 1:19)

識別記号

F I